

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Hemmung der Acetylcholinfreisetzung durch Oxotremorin am Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Peter Wagner
aus Schankweiler/Krs. Bitburg-Prüm
Mainz 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz

HEMMUNG DER ACETYLCHOLINFREISETZUNG
DURCH OXOTREMORIN AM LÄNGSMUSKELSTREIFEN
DES MEERSCHWEINCHENDÜNNDARMS

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Peter Wagner
aus Schankweiler / Krs. Bitburg - Prüm

Mainz 1974

Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

Referent: Professor Dr. E. Muscholl

Korreferent: Professor Dr. K. Löffelholz



MEINEN LIEBEN ELTERN

IN DANKBARKEIT

GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methoden	
1. Präparationsmethode	3
2. Inkubation der Längsmuskelstreifen	8
3. Homogenisieren der Organpräparate und Extraktion des ACh mit 0,4 N Perchlorsäure	11
4. Fällung des ACh als Reineckat	12
5. Anionenaustausch des Reineckat - Anions gegen Cl^- und Demethylierung zur Dimethylaminoverbindung	12
6. Extraktion der Zitronensäurelösung mit Diäthyläther, Mikrodestillation und gaschromatographische Bestimmung	13
7. Statistische Methoden	14
8. Substanzen	14
C. Versuchsergebnisse	
1. Ruhefreisetzung von ACh aus den Längsmuskelstreifen bei der In- kubation in DFP - oder eserin- haltiger Tyrodelösung	15
2. Hemmung der ACh - Freisetzung durch Oxotremorin	17

	Seite
3. Wirkung von Oxotremorin auf die ACh - Freisetzung in Gegenwart von Hexamethonium	23
4. Wirkung von Oxotremorin auf den ACh - Gehalt der Längsmuskel- streifen	26
D. Diskussion	29
E. Zusammenfassung	39
F. Literatur	41

Lebenslauf

A. EINLEITUNG

In der Literatur sind unterschiedliche Befunde über die Oxotremorinwirkung auf die Freisetzung von Acetylcholin (ACh) beschrieben. So zeigten GYÖRGY, PFEIFER & KENYERES, daß Oxotremorin die ACh - Freisetzung aus dem isolierten Ileum der Ratte erhöhte. COX & HECKER fanden dagegen, daß am isolierten Meerschweinchendünndarm die ACh - Freisetzung durch Oxotremorin erniedrigt wurde; sie vermuteten, daß Oxotremorin durch Besetzen von Muskarinrezeptoren die ACh - Freisetzung direkt hemmen kann.

Die eigenen Untersuchungen über die Wirkungsweise von Oxotremorin wurden am isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms durchgeführt, dem nach der Präparation der Plexus myentericus (Auerbach) noch anhaftete. PATON & ZAR (1965; 1968) konnten an diesem Präparat nachweisen, daß Freisetzung und Gehalt von ACh an das Vorhandensein des Auerbachschen Plexus gebunden sind. Denervierte Muskelstreifen enthielten kein ACh; sie setzten daher bei einer Ruheinkubation oder nach elektrischer Stimulation kein ACh frei. Auch DIKSHIT, PATON, SCHAUMANN und JOHNSON vermuteten, daß an der Darmwand das gesamte ACh einen nervalen Ursprung hat.

Am Längsmuskelstreifen kommen drei Typen von cholinergen Fasern vor: 1. Fasern, die von Nervenzellen außerhalb des Längsmuskelstreifens kommen; 2. Interneuronale Fasern, deren zugehörige Zellkörper im Plexus myentericus liegen;

sie bilden Synapsen mit anderen Ganglienzellen des Plexus;

3. Fasern, die mit den glatten Muskelzellen Synapsen bilden; ihre Zellkörper liegen ebenfalls im Plexus (PATON, VIZI & ZAR). Durch jeden dieser drei Fasertypen kann ACh freigesetzt werden; die Freisetzung erfolgt also an ganglionären und postganglionären Synapsen.

Nach dem Freisetzungsmechanismus unterscheidet man zwischen einer Ruhefreisetzung ("resting output") und einer evozierten Freisetzung ("evoked output") von ACh. Als evozierte Freisetzung wird die durch verschiedene chemische Substanzen, z. B. Nikotin oder die durch elektrische Reizung des Präparates hervorgerufene ACh - Freisetzung bezeichnet. Die Ruhefreisetzung unterteilt sich in eine Spontanfreisetzung ("spontaneous release") und in eine Freisetzung durch fortgeleitete Aktionspotentiale ("propagated nervous activity"). Diese Unterteilung wurde von PATON, VIZI & ZAR vorgenommen. Die Spontanfreisetzung von ACh läßt sich in Gegenwart von Hexamethonium bestimmen, das die Freisetzung durch fortgeleitete Aktionspotentiale hemmt (PATON, VIZI & ZAR).

Der isolierte Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms eignet sich besonders gut zur Bestimmung von Freisetzung und Gehalt von ACh, da der Plexus myentericus des Meerschweinchens mehr ACh enthält als jedes andere Säugetiernervengewebe (WELSH & HEYDE).

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob Oxotremorin

eine indirekte oder eine direkte Wirkung auf die ACh - Freisetzung hat. Dazu wurde zunächst die Beeinflussung der ACh - Ruhefreisetzung durch Oxotremorin in verschiedenen Konzentrationen untersucht, wobei die Längsmuskelstreifen in Tyrodelösung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP) oder Eserin als Cholinesterasehemmern inkubiert wurden. Es wurde ferner geprüft, ob Oxotremorin bei der Ruhefreisetzung die Spontanfreisetzung oder die Freisetzung durch fortgeleitete Aktionspotentiale beeinflusst. Dazu wurde die Wirkung von Oxotremorin in Gegenwart von Hexamethonium untersucht, das die durch fortgeleitete Aktionspotentiale hervorgerufene ACh - Freisetzung hemmt (PATON, VIZI & ZAR). Außerdem wurde die Wirkung von Oxotremorin auf den ACh - Gehalt des Gewebes bei Inkubation mit und ohne Cholinesterasehemmstoffen und nach intraperitonealer Injektion untersucht.

B. METHODEN

1. Präparationsmethode

Meerschweinchen von 300 bis 450 g Körpergewicht wurden durch einen Schlag auf den Kopf getötet und entblutet. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und der Dünndarm so vom Mesenterialansatz getrennt, daß ein etwa 1 bis 2 Millimeter breiter Streifen des Mesenteriums am Dünndarm verblieb, der beim Durchtrennen der Längsmuskelschicht mit einem Skalpell als Markierungslinie diente. Dann wurde

der Dünndarm an der Flexura duodenojejunalis und etwa 5 bis 10 cm vor seiner Mündung in den Dickdarm durchtrennt und bis zum Abpräparieren der Längsmuskelstreifen in eine Petrischale mit Tyrodelösung gelegt. Die verwendete Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung: NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; CaCl₂ 0,2 g; MgCl₂ 0,1 g; NaHCO₃ 1,0 g; NaH₂PO₄ 0,05 g; Glucose 1,0 g; Aq. dest. ad 1 000 ml.

Der herauspräparierte Dünndarm wurde dann je nach seiner Länge in 4 bis 6 etwa 15 bis 17 cm lange Teile zerlegt, die auf einen 5 mm dicken Glasstab aufgezogen wurden, der in einem Winkel von etwa 45° gebogen war. Dabei wurden sie gleichzeitig von ihrem Inhalt entleert. Man ließ jedes Darmstück ein Ende des Glasstabes um ein paar mm überragen; dieser überstehende Teil wurde mit einem Faden zusammengebunden, wodurch das Weggleiten des Darmes beim Präparieren verhindert wurde. Dann wurde die Längsmuschelschicht mit einem Skalpell bis auf die darunter liegende Ringmuskulatur dicht an den beiden Seiten des verbliebenen Mesenterialstreifens durchtrennt. Mit einer kleinen anatomischen Pinzette wurde der Längsmuskelstreifen vom nicht zusammengebundenen zum zugebundenen Ende des Darmstückes hin abpräpariert. Dabei wurden durch jeden Zug mit der Pinzette immer nur ein paar mm Muskelstreifen von der Darmwand abgelöst, dann wurde die Pinzette erneut angesetzt und so der ganze Längsmuskelstreifen behut-

sam Stück für Stück abpräpariert. Man erhielt so die Längsmuskulatur als eine dünne, etwa 1,5 cm breite Platte, die auf ihrer Außenseite von Peritoneum und an ihrer Innenseite vom Plexus myentericus überzogen ist.

Diese Präparationsmethode wurde zuerst von PATON & VIZI beschrieben, die den Längsmuskelstreifen jedoch nicht mit einer Pinzette, sondern mit einem Wattebausch abzogen. Ähnliche Methoden sind von AMBACHE für den Kaninchen- und von RANG für den Meerschweinchendünndarm beschrieben worden. PATON & ZAR (1965; 1968) erhielten mit dieser Präparationsmethode nervenfreie Längsmuskelstreifen; war das Darmstück 30 bis 50 cm lang, so haftete nur noch dem proximalen Teil des abgezogenen Muskelstreifens der Plexus myentericus an, während der distale Teil auf unterschiedliche Länge denerviert war.

Da das freigesetzte ACh nur aus dem Plexus myentericus stammt, war es bei den eigenen Versuchen von Bedeutung, daß bei der Präparation der Auerbachsche Plexus möglichst vollständig am abpräparierten Längsmuskelstreifen haften blieb. Daß die oben beschriebene Präparationsmethode gut dazu geeignet ist, beweisen eigene mikroskopische Untersuchungen am isolierten Längsmuskelstreifen. Bei der Färbung des Gewebes mit 1/6 %-tiger Methylenblaulösung stellten sich die zu Ganglien zusammengelagerten Nervenzellen des Plexus myentericus dar (Abb. 1 und 2). Die Muskelstreifen wurden dazu 70 Minuten bei 36 bis 37 °C

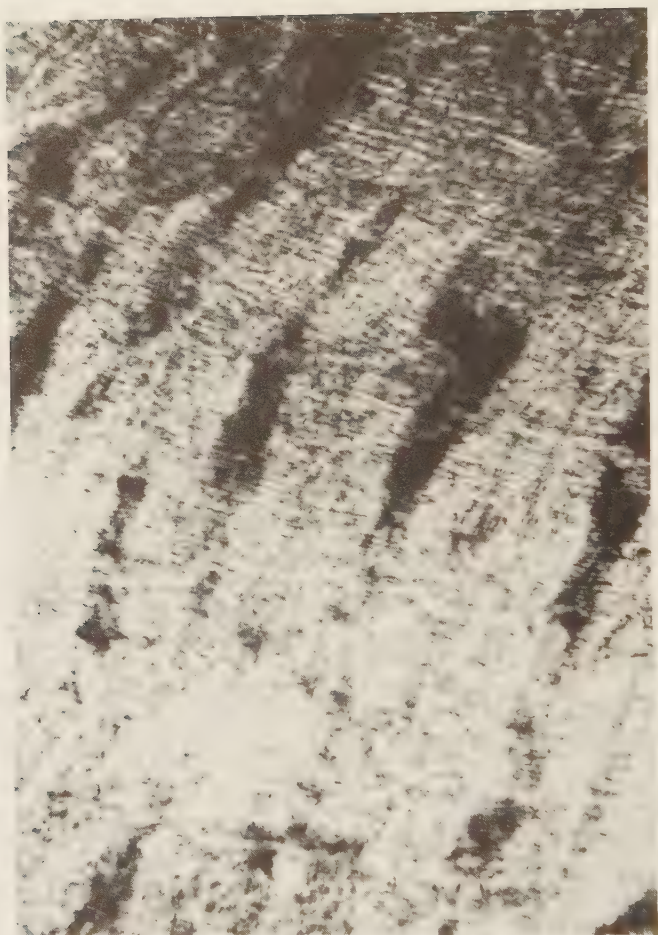


Abb. 1

Ausschnitt aus dem gefärbten Längsmuskelstreifen in
80 - facher Vergrößerung. Die Ganglien des Auerbachschen
Plexus sind als dunkle längliche Bezirke dargestellt.



Abb. 2

Ausschnitt aus einem dieser Ganglien in 400 - facher Vergrößerung. Die Nervenzellen heben sich deutlich vom umgebenden Gewebe ab.

mit 1/6 %-tiger Methylenblaulösung beträufelt, anschließend erfolgte die Feuchtbetrachtung unter dem Photolichtmikroskop.

Um den Betrag des freigesetzten ACh gaschromatographisch möglichst genau bestimmen zu können, war es wichtig, daß möglichst viel ACh vom Gewebe in das Inkubationsmedium abgegeben wurde. Es war daher neben dem Anhaften des Auerbachschen Plexus am gesamten Längsmuskelstreifen auch von Bedeutung, daß eine genügend große Menge von Gewebe zu einem Organpräparat vereinigt wurde. Aus diesem Grunde wurde bei allen Versuchen aus der gesamten Längsmuskulatur eines Tieres nur 1 Präparat hergestellt, indem die isolierten Längsmuskelstreifen mit einem Faden zusammengebunden wurden. Das Gewicht der Längsmuskelpräparate lag zwischen 150 und 300 mg.

Die Genauigkeit der hier angewendeten gaschromatographischen Bestimmungsmethode von ACh wurde an 20 Eichproben untersucht, deren ACh - Konzentration in der Größenordnung der vom Gewebe freigesetzten ACh - Menge lag. Der Variationskoeffizient betrug dabei 8 %.

2. Inkubation der Längsmuskelstreifen

Jedes Organpräparat wurde in ein 10 - ml Zentrifugenglas mit 4 ml Tyrodelösung und DFP (10^{-5} M) oder Eserin (10^{-5} M) in ein Wasserbad gegeben. Ein Thermostat hielt die Badtemperatur bei 37 °C. Das Gewebe wurde dabei ständig

mit Carbogen, einer Mischung aus 95 Vol.-% O_2 und 5 Vol.-% CO_2 begast. Bevor die Proben zur Bestimmung der ACh - Freisetzung gesammelt wurden, wurde das Gewebe 90 Minuten lang äquilibriert. Während dieser Vorinkubationsperiode wurden die Gewebeproben in 20 - Minuten - Abständen mit einer frischen Lösung von derselben Zusammensetzung gespült.

Nach 90 Minuten Vorinkubation wurde die ACh - Ruhefreisetzung gemessen; dazu wurden die Proben über 40 oder 60 Minuten in 10 - Minuten - Abständen oder in zwei 30 - Minuten - Intervallen gesammelt. Die Substanzen, deren Wirkung auf die ACh - Ruhefreisetzung untersucht wurde, wurden dem Inkubationsmedium 10 Minuten (Hexamethonium) oder 30 Minuten nach Beginn (Oxotremorin) der Inkubationszeit zugesetzt; es wurden zunächst 1 bzw. 3 Kontrollproben gesammelt, bei denen die Badflüssigkeit diese Substanzen nicht enthielt. Die Substanzen wurden zugesetzt, indem das Inkubationsmedium durch eine frische Lösung ersetzt wurde, welche die betreffende Substanz in der gewünschten Konzentration enthielt. Die ACh - Freisetzung variierte zum Teil erheblich von Präparat zu Präparat. So lagen z. B. die Einzelwerte der Ruhefreisetzung im ersten 10 - Minuten - Intervall bei Inkubation in DFP - haltiger Tyrodelösung zwischen 7,2 und 1,5 pmol ACh/ mg Gewebe. Daher wurde bei jedem einzelnen Versuch die ACh - Freisetzung in Gegenwart der untersuchten Substanz in Prozent

der Freisetzung der vorhergehenden Kontrollinkubationsperiode ohne diese Substanz ausgedrückt und mit der analogen Änderung in den zugehörigen Kontrollversuchen verglichen.

Ursachen für die unterschiedlich großen ACh - Beträge, die unter gleichen Inkubationsbedingungen freigesetzt wurden, mögen die unterschiedliche Qualität der Präparation und der von Tier zu Tier variierende Cholinacetyltransferasegehalt des untersuchten Gewebes sein. Untersuchungen von FELDBERG & LIN zeigen, daß der Cholinacetyltransferasegehalt längs der Darmwand des Meerschweinchens in den einzelnen Darmabschnitten, aber auch von Tier zu Tier variiert.

Nach jeder einzelnen Inkubation wurde die Badflüssigkeit in vorgekühlte 20 - ml Zentrifugengläser gegeben, die eine bestimmte Menge an Propionylcholinjodid (PCh) als inneren Standard und 0,2 ml Tetraäthylammoniumchlorid-pentahydratlösung (TEA) als Kopräzipitans enthielten. Die Menge des inneren Standards entsprach dabei dem erwarteten Betrag an freigesetztem ACh.

Bei einigen Organpräparaten wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten lediglich der ACh - Gehalt des Gewebes bestimmt. Außerdem wurde mehreren Meerschweinchen Oxotremorin (1 mg/ kg Körpergewicht) oder physiologische NaCl - Lösung (0,5 ml/ kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Sie wurden nach der Injektion 30 Minuten beobachtet

und dann getötet. Die Längsmuskelstreifen wurden hier nicht inkubiert, sondern sofort nach der Präparation nach der unten beschriebenen Methode aufgearbeitet.

3. Homogenisieren der Organpräparate und Extraktion des ACh mit 0,4 N Perchlorsäure

Das weitere Aufarbeiten der Organ- und Perfusatproben erfolgte nach einer von KILBINGER beschriebenen Methode zur gaschromatographischen ACh - Bestimmung am Kaninchenherzen. Nach der letzten Inkubationsperiode wurden die Organproben mit Filterpapier getrocknet, gewogen und mit dem "Ultra - Turrax" in 3 ml eiskalter 0,4 N Perchlorsäure als Extraktionsmittel in Zentrifugengläsern homogenisiert. Der "Ultra - Turrax" wurde dann mit 3 ml Perchlorsäure nachgespült, um die noch an ihm haftenden Gewebstücke für die Analyse zu erhalten. Nach 30 - minütigem Stehen wurden die Homogenate 15 Minuten bei 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in vorgekühlte 20 - ml Zentrifugengläser überführt, in welche PCh als innerer Standard vorgelegt worden war. Zu dem dabei im Zentrifugenglas verbleibenden Rückstand, der aus den homogenisierten Muskelstreifen bestand, wurde dann die Perchlorsäure gegeben, mit der der "Ultra - Turrax" nachgespült worden war. Der Rückstand wurde umgerührt, 15 Minuten in Eis stehen gelassen und anschließend 15 Minuten bei 0 °C abzentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und mit Kaliumcarbonatlösung (5 M)

auf einen pH - Wert zwischen 4 und 4,5 gebracht. Dann wurde das ausgefallene Kaliumperchlorat 15 Minuten bei 0 °C abzentrifugiert und der Überstand in vorgekühlte 20 - ml Zentrifugengläser gegeben, die jeweils 0,2 ml einer 1 mM TEA - Lösung enthielten.

4. Fällung des ACh als Reineckat

In den abzentrifugierten Überstand der Organproben und in die Inkubationsproben wurde nach dem oben beschriebenen Zusatz von PCh und TEA 4 ml eiskalte 2 %-tige Reineckelösung gegeben, wodurch die Cholinester als Reineckate gefällt wurden. Danach wurde das Gemisch für 1 Stunde in Eis gestellt und anschließend 3 Minuten bei 0 °C abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Der Reineckatniederschlag wurde dann mit 1 ml eiskaltem Propan-1-ol gewaschen und über Nacht in einem Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet.

5. Anionenaustausch des Reineckat - Anions gegen Cl^- und Demethylierung zur Dimethylaminoverbindung

Der über Nacht getrocknete Niederschlag wurde mit 0,5 ml einer Suspension des Ionenaustauschers Biorex 9 in wasserfreiem Methanol behandelt. Der methanolische Überstand wurde in ein 1 - ml Reagenzglas überführt, mit N_2 trocken-geblasen, dann mit 0,1 ml eines frisch zubereiteten Demethylierungsgemisches versetzt und anschließend für 30 Minuten in ein Wasserbad gegeben. Die Zentrifugen-

gläser wurden mit Teflonstopfen verschlossen. Ein Thermostat hielt die Temperatur des Wasserbades bei 80 °C. Das Demethylierungsgemisch bestand aus einer 50 mM Thiophenol - Na - Lösung und einer 25 mM Thiophenol-lösung in wasserfreiem Methyläthylketon. Nach der Demethylierungsreaktion lagen das PCh und das ACh als tertiäre Amine vor, das PCh als Dimethylaminoäthylpropionat und das ACh als Dimethylaminoäthylacetat. Nach dem Ende der Demethylierung wurde jeder Probe 20 µl einer 0,5 M Zitronensäurelösung und 0,1 ml Pentan zugesetzt. Die Proben wurden dann 2 Minuten geschüttelt und anschließend bei 0 °C abzentrifugiert; der Überstand wurde abgesaugt.

6. Extraktion der Zitronensäurelösung mit Diäthyläther, Mikrodestillation und gaschromatographische Bestimmung

Zu der Zitronensäurelösung wurde dann 0,1 ml eiskalter Diäthyläther gegeben. Die im Ätherextrakt vorliegenden tertiären Amine wurden dann durch Mikrodestillation konzentriert. Dazu wurde der Ätherextrakt mit einer Hamilton-spritze in ein Mikrodestillationskölbchen überführt und in einem Wasserbad bei 40 °C bis auf ein Volumen von 3 bis 5 µl eingedampft, wovon 2 mal 2 µl in den Gaschromatographen injiziert wurden. Die dabei verwendeten gaschromatographischen Parameter wurden von KILBINGER beschrieben.

Die Menge des in der Probe enthaltenen ACh lässt sich aus dem Verhältnis der Peakhöhen von ACh und PCh im Chromatogramm errechnen, da die als innerer Standard zugesetzte Menge an PCh bekannt ist. Der ACh - Gehalt jeder Probe wurde als arithmetisches Mittel aus den beiden Werten der Doppelbestimmung ermittelt. Keine der verwendeten Substanzen interferierte mit der gaschromatographischen ACh - Bestimmung. ACh war der einzige Cholinester, den das Gewebe enthielt und der in das Inkubationsmedium freigesetzt wurde.

7. Statistische Methoden

Mittelwertsvergleiche wurden mit dem Wilcoxon - Rangtest zur Feststellung von signifikanten Differenzen ($P < 5 \%$) durchgeführt (CAMPBELL). Streuungsangaben in Verbindung mit dem Mittelwert stellen den mittleren Fehler des Mittelwertes dar ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$); n ist die Anzahl der Einzelversuche.

8. Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet: Acetylcholinjodid, Propionylcholinjodid (Fluka, Buchs, Schweiz); Diisopropylfluorphosphat (DFE; Roti, Karlsruhe); Eserin (E. Merck, Darmstadt); Oxotremorin (EGA Chemie, Steinheim); Atropinsulfat (C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim); Hexamethoniumjodid (Casella, Frankfurt).

C. VERSUCHSERGEBNISSE

1. Ruhefreisetzung von ACh aus den Längsmuskelstreifen bei der Inkubation in DFP- oder eserinhaltiger Tyrodelösung

Zur Bestimmung der ACh - Ruhefreisetzung aus dem Gewebe wurden die Muskelstreifen während zwei 30 - Minuten - Perioden in DFP - haltiger Tyrodelösung inkubiert. Die Freisetzung betrug für die ersten 30 Minuten der Inkubation $9,9 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x 30 min (n = 13) und für die folgenden 30 Minuten $8,1 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x 30 min (n = 5; Tab. 1). Ein Vergleich dieser beiden Mittelwerte mit dem Wilcoxon - Rangtest zeigt, daß sie sich nicht signifikant unterscheiden ($P > 5\%$).

Bei der Messung der ACh - Ruhefreisetzung über 60 Minuten in 10 - Minuten - Abständen in DFP - haltiger Tyrodelösung zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Freisetzung von $3,9 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x 10 min für das erste auf $3,2 \pm 0,5$ pmol ACh/ mg x 10 min für das letzte 10 - Minuten - Intervall (n = 10; Abb. 3). Die Mittelwerte aus der Summe der ACh - Freisetzungen während der drei ersten ($13,2 \pm 1,1$ pmol ACh/ mg x [3x10 min]) und der drei letzten 10 - Minuten - Perioden der Ruheinkubation ($9,8 \pm 0,9$ pmol ACh/ mg x [3x10 min]; Tab. 1) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($P > 5\%$).

Ein Vergleich zwischen der totalen ACh - Freisetzung während

Tabelle 1

Gegenüberstellung der Werte der ACh - Ruhefreisetzung während einer 30 - minütigen Inkubationsperiode mit der Summe der Freisetzungen aus drei 10 - Minuten - Perioden

Inkubations- periode	ACh - Freisetzung	
	pmol ACh/ mg x 30 min	pmol ACh/ mg x [3x10 min]
0 - 30 min	9,9 ± 0,6 (13)	13,2 ± 1,1 (30)
30 - 60 min	8,1 ± 0,6 (5)	9,8 ± 0,9 (10)
30 - 60 min zusätzlich mit OT 10 ⁻⁴ M	6,8 ± 0,8 (5)	6,2 ± 0,6 (11)

Die Inkubation erfolgte in DFP - haltiger Tyrodelösung, der bei zwei Versuchsreihen Oxotremorin 10⁻⁴ M (OT in der Tab.) zugesetzt war. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Die Anzahl der Einzelversuche (n) steht in Klammern.

einer 30 - Minuten - Periode und der Summe der Freisetzen aus drei 10 - Minuten - Perioden zeigt, daß mehr ACh in das Bad freigesetzt wurde, wenn die Inkubationsflüssigkeit in 10 - Minuten - Abständen erneuert wurde, wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist. Beim Mittelwertsvergleich ergeben sich jedoch sowohl für die erste wie auch für die zweite 30 - Minuten - Periode keine signifikanten Unterschiede ($P < 10 \%$; $> 5 \%$).

Um die Wirkung des Cholinesterasehemmstoffes DFP mit der Wirkung von Eserin auf die ACh - Freisetzung zu vergleichen, wurden die Längsmuskelpräparate 60 Minuten lang in 10 - Minuten - Intervallen in eserinhaltiger Tyrodelösung inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Freisetzung in Anwesenheit von Eserin in derselben Größenordnung lag wie die Freisetzung in Gegenwart von DFP (Abb. 3). Bei der Inkubation in eserinhaltiger Tyrodelösung nahm der Betrag an freigesetztem ACh von $3,9 \pm 0,9$ pmol ACh/ mg x 10 min für das erste 10 - Minuten - Intervall auf $3,0 \pm 0,9$ pmol ACh/ mg x 10 min im letzten 10 - Minuten - Intervall kontinuierlich ab ($n = 6$; Abb. 3).

2. Hemmung der ACh - Freisetzung durch Oxotremorin

Die Ruhefreisetzung von ACh läßt sich durch das stark muskarinartig wirkende Oxotremorin am isolierten Meerschweinchendünndarm hemmen (COX & HECKER). Die Längsmuskelpräparate wurden zunächst 30 Minuten in DFP - haltiger

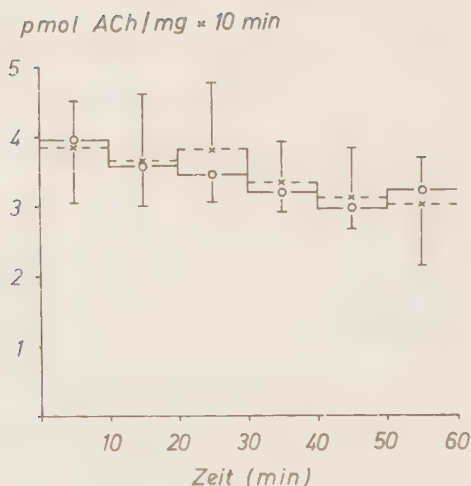


Abb. 3

In 10 - Minuten - Abständen (Abszisse) bestimmte ACh - Ruhefreisetzung (pmol ACh/ mg $\times$ 10 min; Ordinate) während einer 60 - minütigen Inkubation in DFP- (o—o) oder eserinhaltiger (x---x) Tyrodelösung. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm s_{\bar{x}}$ als vertikale Linien) der einzelnen Inkubationsperioden. Die Anzahl der Einzelversuche betrug bei der Inkubation in DFP - haltiger Tyrodelösung 10 bzw. 6 bei der Inkubation mit Eserin.

Tyrodelösung und danach 30 Minuten zusätzlich mit Oxtremorin 10^{-4} M inkubiert. Die ACh - Freisetzung wurde dabei von $8,1 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x 30 min (n = 5) während der Kontrollperiode durch Oxtremorin auf $6,8 \pm 0,8$ pmol ACh/ mg x 30 min (n = 5; Tab. 1) erniedrigt. Beide Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($P > 5\%$).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Gewebe in drei 10 - Minuten - Abständen wieder mit DFP - haltiger Tyrodelösung und für drei weitere 10 - Minuten - Perioden zusätzlich mit Oxtremorin inkubiert. Die Zugabe von Oxtremorin 10^{-4} M hemmte die Ruhefreisetzung von $3,5 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x 10 min (21. - 30. Minute) auf $2,1 \pm 0,3$ pmol ACh/ mg x 10 min (31. - 40. Minute; n = 11). Der Mittelwert aus der Summe der in drei 10 - Minuten - Abständen bestimmten ACh - Freisetzungen nach Zusatz von Oxtremorin 10^{-4} M (31. - 60. Minute) betrug $6,2 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x [3x10 min] (n = 11; Tab. 1). Der zugehörige Vergleichswert bei nicht erneuertem Inkubationsmedium betrug $6,8 \pm 0,8$ pmol ACh/ mg x 30 min (n = 5; Tab. 1); beide Werte liegen in derselben Größenordnung. Die Summe der in 10 - Minuten - Abständen bestimmten Freisetzungen in Gegenwart von Oxtremorin unterscheidet sich signifikant ($P < 5\%$) vom Wert der zugehörigen Kontrollversuche, bei denen die ACh - Freisetzung von der 31. - 60. Minute in 10 - Minuten - Abständen in Abwesenheit von Oxtremorin bestimmt wurde.

Da die Absolutwerte der ACh - Freisetzung von Präparat zu Präparat zum Teil erheblich variierten, werden die Effekte der untersuchten Oxotremorinkonzentrationen auf die ACh - Ruhefreisetzung als Prozentwerte angegeben. Dazu wurde die ACh - Freisetzung von der 31. bis zur 40. Minute bei Anwesenheit von Oxotremorin mit der Freisetzung der vorhergehenden oxotremorinfreien Inkubationsperiode (21. - 30. Minute) verglichen. Oxotremorin zeigte dabei eine dosisabhängige Hemmung der ACh - Ruhefreisetzung (Abb. 4). Oxotremorin 10^{-5} und 10^{-4} M hemmten die Freisetzung signifikant auf $72,8 \pm 6,0 \%$ ($P < 5 \%$; $n = 6$) bzw. $65,0 \pm 7,4 \%$ ($P < 1 \%$; $n = 11$); der Hemmeffekt durch Oxotremorin 10^{-6} M ($86,0 \pm 8,1 \%$; $n = 4$) war nicht signifikant ($P > 5 \%$). Der zugehörige Vergleichswert aus der Kontrollfreisetzung betrug $96,6 \pm 7,6 \%$ ($n = 11$; Abb. 4). Oxotremorin hemmte die ACh - Freisetzung so lange es im Inkubationsmedium enthalten war, was in Abb. 5 dargestellt ist.

Auch in Anwesenheit von Eserin als Cholinesterasehemmstoff wurde die Hemmung der ACh - Ruhefreisetzung durch Oxotremorin beobachtet. Dabei wurde durch Inkubation mit Oxotremorin 10^{-5} M die Ruhefreisetzung auf $68,2 \pm 16,3 \%$ gehemmt; dieser Hemmeffekt war signifikant ($P < 5 \%$; $n = 5$).

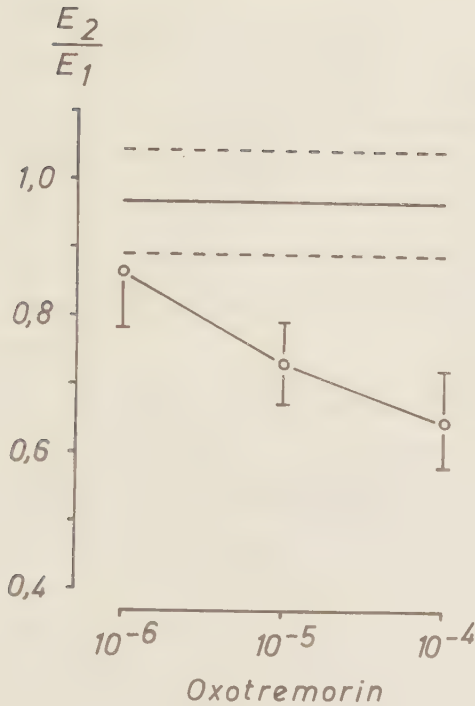


Abb. 4

Dosiswirkungskurve von Oxotremorin. Die ACh - Freisetzung von der 31. - 40. Minute bei Anwesenheit von Oxotremorin (E_2) wurde mit der Freisetzung der vorhergehenden oxotremorinfreien Inkubationsperiode (21. - 30. Minute; E_1) verglichen. Inkubationsmedium: DFP - haltige Tyrodelösung. Ordinate: Verhältnis E_2/E_1 . Abszisse: untersuchte Oxotremorinkonzentrationen o—o Hemmeffekt durch Oxotremorin 10^{-4} ($n = 11$), 10^{-5} ($n = 6$) und 10^{-6} M ($n = 4$). Das Verhältnis E_2/E_1 der zugehörigen Kontrollversuche ($n = 11$) ist als durchgezogene horizontale Linie dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ mittlerem Fehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

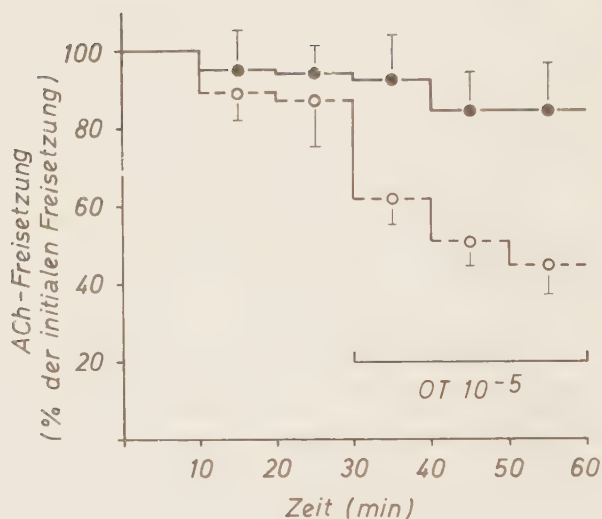


Abb. 5

Zeitlicher Verlauf der ACh - Ruhefreisetzung aus den Längsmuskelstreifen in Gegenwart und Abwesenheit von Oxotremorin. Die Längsmuskelstreifen wurden während 6 aufeinanderfolgenden 10 - Minuten - Perioden in DFP - haltiger Tyrodelösung inkubiert. Ordinate: ACh - Freisetzung in Prozent der initialen Freisetzung, d. h. der Freisetzung von der 1. - 10. Minute. Abszisse: Inkubationszeit. ●—● ACh - Freisetzung der Kontrollversuche (n = 11); die initiale Freisetzung betrug $3,9 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg x 10 min. ○---○ ACh - Freisetzung aus den Muskelstreifen, die von der 31. Minute an mit Oxotremorin 10^{-5} M inkubiert wurden (n = 6; OT 10^{-5} in der Abb.); die initiale Freisetzung betrug hier $5,0 \pm 0,8$ pmol ACh/ mg x 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm s_{\bar{x}}$ als vertikale Linien) der Freisetzungen während der einzelnen Inkubationsperioden.

4. Wirkung von Oxotremorin auf die ACh - Freisetzung in
Gegenwart von Hexamethonium

Hexamethonium hemmt die ACh - Ruhefreisetzung um den Betrag, der durch fortgeleitete Aktionspotentiale aus den cholinergen Nervenfasern freigesetzt wird (PATON, VIZI & ZAR). Daher stammt das bei der Ruheinkubation mit Hexamethonium freigesetzte ACh nur aus der Spontanfreisetzung an den Nervenendigungen.

Um die Wirkung von Hexamethonium auf die ACh - Ruhefreisetzung zu bestimmen, wurden die Längsmuskelstreifen 10 Minuten in DFP - haltiger Tyrodelösung und anschließend über drei 10 - Minuten - Intervalle zusätzlich mit Hexamethonium $2,8 \times 10^{-4}$ M inkubiert (Abb. 6). Für die Berechnung der Hexamethoniumwirkung wurde die ACh - Freisetzung in Anwesenheit von Hexamethonium wieder mit der Freisetzung der vorherigen hexamethoniumfreien Inkubationsperiode (1. - 10. Minute) verglichen. Durch den Zusatz von Hexamethonium im zweiten 10 - Minuten - Intervall wurde die ACh - Ruhefreisetzung auf $66,3 \pm 3,6$ % gehemmt ($n = 6$; Abb. 6). Bei den zugehörigen Kontrollversuchen ohne Hexamethonium war die Ruhefreisetzung im zweiten gegenüber dem ersten 10 - Minuten - Intervall auf $89,6 \pm 9,4$ % ($n = 11$) vermindert; beide Mittelwerte unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 5$ %). Bei der weiteren Inkubation mit Hexamethonium war die

Ruhefreisetzung auf $62,0 \pm 4,2 \%$ in der dritten und auf $52,8 \pm 6,2 \%$ in der vierten 10 - Minuten - Periode vermindert (Abb. 6).

Die von PARON, VIZI & ZAR beschriebenen Hemmeffekte auf die ACh - Ruhefreisetzung am isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms betrugen für Hexamethonium 5×10^{-5} M $61,9 \pm 4,8 \%$ und für Hexamethonium 10^{-4} M $53,0 \pm 6,6 \%$. Dieser Hemmeffekt liegt etwa in derselben Größenordnung wie bei den eigenen Versuchen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob Oxo-tremorin eine Wirkung auf die ACh - Spontanfreisetzung hat. Dazu wurden die Längsmuskelstreifen zunächst wieder 10 Minuten in DFP - haltiger Tyrodelösung und danach während drei 10 - Minuten - Perioden zusätzlich mit Hexamethonium $2,8 \times 10^{-4}$ M inkubiert; von der 31. bis zur 40. Minute wurde dem Inkubationsmedium zusätzlich Oxotremorin 10^{-4} M zugesetzt (Abb. 6). Hexamethonium erniedrigte hier die ACh - Freisetzung auf $69,3 \pm 2,8 \%$ im zweiten und auf $57,5 \pm 10,6 \%$ im dritten 10 - Minuten - Intervall. Nach Zugabe von Oxotremorin zum Inkubationsmedium betrug die ACh - Freisetzung im vierten 10 - Minuten - Intervall $54,8 \pm 6,6 \%$ ($n = 6$) der initialen Freisetzung; Oxotremorin zeigte hier also keinen meßbaren Effekt auf die Spontanfreisetzung von ACh.

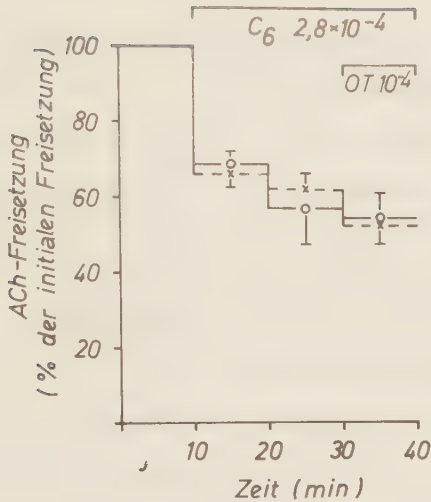


Abb. 6

Wirkung von Oxotremorin auf die ACh - Ruhefreisetzung aus den Längsmuskelstreifen in Gegenwart von Hexamethonium. Die Bestimmung der ACh - Freisetzung erfolgte in vier 10 - Minuten - Abständen (Abszisse). Ordinate: ACh - Freisetzung in Prozent der initialen Freisetzung, d. h. der Freisetzung von der 1. - 10. Minute. Der Zusatz von Hexamethonium $2,8 \times 10^{-4}$ M (C_6 $2,8 \times 10^{-4}$ in der Abb.) zu der DFP - haltigen Tyrodelösung erfolgte bei beiden Versuchsreihen in der 11. Minute. o---o ACh - Freisetzung in Gegenwart von Hexamethonium ($n = 6$); die initiale Freisetzung betrug $5,2 \pm 0,5$ pmol ACh/ mg $\times$ 10 min. x---x ACh - Freisetzung in Gegenwart von Hexamethonium und Oxotremorin 10^{-4} M (OT 10^{-4} in der Abb.), das dem Inkubationsmedium in der 31. Minute zugesetzt wurde ($n = 6$); die initiale Freisetzung betrug hier $4,1 \pm 0,6$ pmol ACh/ mg $\times$ 10 min. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm s_{\bar{x}}$ als vertikale Linien) der Freisetzungen während der einzelnen Inkubationsperioden.

4. Wirkung von Oxotremorin auf den ACh - Gehalt der Längsmuskelstreifen

Versuche von CAMPBELL, HANIN & JENDEN zeigen, daß nach Injektion von Oxotremorin der ACh - Gehalt des Gehirns zunimmt. Es wurde daher untersucht, ob die verminderte ACh - Freisetzung während der Inkubation der Längsmuskelstreifen mit Oxotremorin mit einer Zunahme des ACh - Gehaltes im Gewebe einhergeht.

Dazu wurden die Längsmuskelstreifen 150 Minuten in DFP- oder eserinhaltiger Tyrodelösung inkubiert. Während der letzten 30 Minuten der Inkubationszeit wurde mit Ausnahme der zugehörigen Kontrollversuche der Badflüssigkeit Oxotremorin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Der ACh - Gehalt der Längsmuskelstreifen war nach der Inkubation mit Eserin signifikant ($P < 5\%$) höher als nach der Inkubation mit DFP. Wenn das Gewebe in Gegenwart von DFP oder Eserin mit Oxotremorin inkubiert wurde, unterschied sich der ACh - Gehalt der Längsmuskelstreifen nicht signifikant vom Gehalt der Kontrollstreifen (Tab. 2).

Diesen Befund könnte man dadurch erklären, daß die Speicherkapazität der cholinergen Nerven durch die Ansammlung von ACh schon während der Inkubation mit Cholinesterasehemmern erschöpft wurde. Oxotremorin könnte dann den endogenen ACh - Gehalt nicht weiter erhöhen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Muskelstreifen 30 Minuten lang

Tabelle 2

Wirkung von Oxotremorin auf den ACh - Gehalt der
Längsmuskelstreifen

Behandlung	ACh - Gehalt (pmol ACh/ mg)		
	ohne Cholin- esterasehemmer	DFP 10^{-5} M	Eserin 10^{-5} M
Kontrollen	240 $\pm$ 12 (9)	318 $\pm$ 16 (10)	380 $\pm$ 39 (6)
OT 10^{-4} M	280 $\pm$ 11 (8)	296 $\pm$ 23 (7)	-
OT 10^{-5} M	-	301 $\pm$ 14 (6)	388 $\pm$ 21 (5)
OT 10^{-6} M	-	286 $\pm$ 26 (4)	-

Bei den Versuchen ohne Cholinesterasehemmer betrug die Inkubationszeit 30 Minuten. Wenn die Tyrodelösung DFP oder Eserin als Cholinesterasehemmstoffe enthielt, wurde das Gewebe 150 Minuten lang inkubiert; dabei wurde dem Inkubationsmedium mit Ausnahme der zugehörigen Kontrollversuche von der 121. - 150. Minute Oxotremorin (OT in der Tab.) in den oben angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm s_{\bar{x}}$. Die Anzahl der Einzelversuche (n) steht in Klammern.

in Tyrodelösung und Oxotremorin 10^{-4} M ohne Zusatz eines Cholinesterasehemmstoffes inkubiert. Hierbei wurde durch Oxotremorin der ACh - Gehalt des Gewebes gegenüber den zugehörigen Kontrollversuchen signifikant ($P < 5 \%$) erhöht.

Es wurde ferner untersucht, ob Oxotremorin auch nach intra-peritonealer Injektion den ACh - Gehalt der Längsmuskelstreifen erhöht. Dazu wurde bei 3 Meerschweinchen Oxotremorin (1 mg/ kg Körpergewicht) und bei 4 Kontrolltieren physiologische Kochsalzlösung (0,5 ml/ kg Körpergewicht) i. p. injiziert. Die Tiere wurden 30 Minuten beobachtet und anschließend getötet. Die Meerschweinchen, denen Oxotremorin injiziert worden war, zeigten schon nach kurzer Zeit typische Symptome für das Überwiegen des cholinergen Nervensystems; 4 bis 5 Minuten nach der Injektion von Oxotremorin zeigte sich bei allen Tieren ein leichter Tremor, nach weiteren 2 Minuten trat eine Muskelstarre ein, die besonders an den Hinterbeinen der Tiere ausgeprägt war; 4 bis 6 Minuten später kam eine Akinese der hinteren Extremitäten dazu. Der Tremor wurde mit zunehmender Zeit stärker. 9 Minuten nach der Oxotremorininjektion wurde bei einem Tier der Abgang von Kot beobachtet, und nach 15 bis 20 Minuten zeigten die Tiere einen starken Speichelfluß und eine Miosis. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurde eine starke Darmperistaltik beobachtet. Tremor, Muskelstarre und Akinese sind die Leitsymptome des Parkinson - Syndroms, bei dem ebenfalls

das cholinerge Nervensystem überwiegt. Die 4 Kontrolltiere zeigten nach der Injektion von physiologischer NaCl - Lösung kein auffällig verändertes Verhalten.

Die Längsmuskelstreifen wurden hier nicht inkubiert, sondern sofort nach der Präparation aufgearbeitet. Der Gehalt an endogenem ACh betrug bei den Kontrolltieren 171 ± 2 pmol ACh/ mg (n = 4). Oxotremorin erhöhte den Gehalt auf 232 ± 20 pmol ACh/ mg (n = 3). Beide Mittelwerte unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 5\%$).

D. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die ACh - Ruhefreisetzung aus dem Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms und ihre Beeinflussung durch Oxotremorin und Hexamethonium untersucht.

Die Ruhefreisetzung wurde in Gegenwart von DFP oder Eserin als Cholinesterasehemmstoffen untersucht. PATON & ZAR (1965; 1968) konnten nachweisen, daß am isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms das gesamte freigesetzte ACh aus dem anhaltenden Plexus myentericus stammt, und daß die glatte Muskulatur weder ACh enthält noch freisetzt. Die Cholinesterase, die gehäuft an den Synapsen und hier besonders

an der postsynaptischen Membran vorkommt (KOELLE, 1971), erschwert den Nachweis von ACh im Inkubationsmedium erheblich, denn sie hydrolysiert das ACh schneller, als man es gewinnen und nachweisen kann. Es war daher bei den eigenen Versuchen notwendig, einen Cholinesterasehemmstoff zuzusetzen.

Durch die Blockade der Cholinesterase sammelt sich in den cholinergen Nervenendigungen neben dem dort in Vesikeln gespeicherten ACh zusätzliches ACh an, das als "Surplus - ACh" bezeichnet wird (KOELLE, 1971). Fortgeleitete Aktionspotentiale setzen ACh nur aus dem vesikulären Pool frei, während wahrscheinlich ein Ionenaustauschmechanismus für die unphysiologische Freisetzung aus dem Surplus - Pool verantwortlich ist (KOELLE, 1971).

Die Wirkungen von DFP und Eserin auf die ACh - Ruhefreisetzung unterscheiden sich nicht meßbar voneinander, wie in Abb. 3 zu sehen ist. Bei der Bestimmung der ACh - Ruhefreisetzung über 60 Minuten in 10 - Minuten - Abständen zeigte sich bei beiden Substanzen ein kontinuierlicher Abfall der ACh - Freisetzung. Eine ähnliche Abnahme der Freisetzungsrates von ACh mit der Inkubationszeit ist auch von JOHNSON am isolierten Meerschweinchenileum beschrieben worden.

Bei den eigenen Versuchen liegen die Werte der ACh -

Ruhefreisetzung zwischen 0,39 und 0,50 pmol ACh/ mg x min je nach dem Zeitpunkt der in 10 - Minuten - Abständen vorgenommenen Messung. Bei Untersuchungen von PATON & ZAR (1968) an demselben Präparat betrug die Ruhefreisetzung 0,53 pmol ACh/ mg x min und bei PATON, VIZI & ZAR 0,28 pmol ACh/ mg x min. Die eigenen Werte liegen also zwischen denen, die von diesen Autoren angegeben wurden.

Bei einer 30 - minütigen Inkubationszeit in DFP - haltiger Tyrodelösung wurde mehr ACh freigesetzt, wenn die Badflüssigkeit in 10 - Minuten - Abständen erneuert wurde (Tab. 1); die Unterschiede zu den Werten der ACh - Freisetzung bei nicht erneuertem Inkubationsmedium waren jedoch nicht signifikant ($P < 10\%$; $> 5\%$). Eine größere totale ACh - Freisetzung in wiederholt wechselnde Inkubationsflüssigkeiten im Vergleich zur Freisetzung in ein einzelnes, nicht erneuertes Inkubationsmedium ist auch von SCHAUMANN und von JOHNSON bei Versuchen am isolierten Meerschweinchendünndarm beobachtet worden. Dieselben Befunde wurden ferner von BRODKIN & ELLIOT für die ACh - Freisetzung an Hirnschnitten beschrieben; die Autoren zeigten, daß die Freisetzung an den Hirnschnitten abnahm, wenn die ACh - Konzentration in der Badflüssigkeit anstieg. Diese Beobachtungen konnten auch von BIRKS & MACINTOSH bei Versuchen am Ganglion cervicale superius der Katze bestätigt werden.

Bei der ACh - Ruhefreisetzung unterscheidet man eine Freisetzung durch fortgeleitete Aktionspotentiale und eine Spontanfreisetzung (PATON, VIZI & ZAR). Das Auslösen von fortgeleiteten Aktionspotentialen durch freigesetztes ACh läßt sich durch Hexamethonium verhindern, das als quartäre Ammoniumverbindung ein kompetitiver Antagonist zu ACh bei der Übertragung von Aktionspotentialen in den Ganglien ist (MCISAAC & MILLERSCHOEN). An den Ganglien blockiert es die nikotinartige Wirkung von ACh, indem es an den Ganglienzellen die Nikotinrezeptoren besetzt (IORIO & MCISAAC; TRENDLENBURG; KOELLE, 1972). Dadurch wird die postsynaptische Membran gegen die Wirkung von ACh stabilisiert, das aus den präsynaptischen Nervenendigungen freigesetzt wird (VOLLE & KOELLE). Eine Depolarisation der postsynaptischen Membran und das Auslösen eines fortgeleiteten Aktionspotentials durch freigesetztes ACh ist deshalb nicht mehr möglich. Daher stammt das bei der Inkubation mit Hexamethonium gemessene ACh nur aus der Spontanfreisetzung an den ganglionären und postganglionären Synapsen.

Bei den eigenen Untersuchungen hemmte Hexamethonium $2,8 \times 10^{-4}$ M die ACh - Ruhefreisetzung signifikant ($P < 5\%$) auf $66,3 \pm 3,6\%$ beim ersten Zusatz zum Inkubationsmedium (11. - 20. Minute); in den beiden

folgenden 10 - Minuten - Intervallen war die Freisetzung noch stärker gehemmt (auf $62,0 \pm 4,2 \%$ bzw. $52,8 \pm 6,2 \%$; Abb. 6). Bei Versuchen von PATON, VIZI & ZAR an demselben Präparat war die Ruhefreisetzung durch Hexamethonium ebenfalls auf etwa 50 % gehemmt. Die ACh - Ruhefreisetzung würde an diesem Präparat daher zu etwa 50 % durch fortgeleitete Aktionspotentiale hervorgerufen; die restlichen 50 % würden dann aus der spontanen Freisetzung von ACh resultieren.

Oxotremorin zeigt¹ eine dosisabhängige Hemmung der ACh - Ruhefreisetzung (Abb. 4). Dabei hemmten Oxotremorin 10^{-4} und 10^{-5} M die Freisetzung signifikant auf $65,0 \pm 7,4 \%$ ($P < 1 \%$) bzw. $72,8 \pm 6,0 \%$ ($P < 5 \%$). Die Freisetzung war solange gehemmt, wie Oxotremorin im Inkubationsmedium enthalten war (Abb. 5). Die Cholinesterasehemmer DFP und Eserin zeigten keine unterschiedliche Wirkung auf den Hemmeffekt von Oxotremorin.

COX & HECKER konnten am isolierten Meerschweinchen-dünndarm nachweisen, daß Oxotremorin die ACh - Ruhefreisetzung hemmt. Eine hemmende Wirkung von Oxotremorin auf die durch elektrische Reizung evozierte ACh - Freisetzung an Hirnschnitten der Ratte wurde von SZERB & SOMOGYI beobachtet.

Die Ursache für die in Gegenwart von Oxotremorin ver-

minderte Freisetzung von ACh liegt nicht darin, daß Oxotremorin mit der ACh - Synthese interferiert, da der ACh - Gehalt des Gewebes nach Inkubation mit Oxotremorin nicht vermindert war (Tab. 2). Eine Hemmung der ACh - Synthese durch Oxotremorin ist außerdem deswegen unwahrscheinlich, weil unmittelbar nach Zugabe von Oxotremorin zur Badflüssigkeit die Verminderung der ACh - Ruhefreisetzung einsetzte. Es ist daher wahrscheinlicher, daß Oxotremorin mit dem ACh - Freisetzungsmechanismus interferiert. Nach SZERB & SOMOGYI läßt sich der Wirkungsmechanismus von Oxotremorin aus seinen starken muskarinartigen Eigenschaften erklären. Der Hemmeffekt von Oxotremorin auf die ACh - Freisetzung ließ sich bei den Versuchen von diesen beiden Autoren durch Atropin aufheben, das eine starke anti-muskarinartige Wirkung besitzt; dabei erhöhte Atropin allein die Freisetzung nicht. Diese Wechselwirkung zwischen Oxotremorin und Atropin deutet auf einen gemeinsamen Wirkungsort hin, den nach der Meinung von SZERB & SOMOGYI die Muskarinrezeptoren darstellen.

Beide Autoren interpretierten den Wirkungsmechanismus von Oxotremorin mit einem lokalen negativen Feedback-Mechanismus, über den Oxotremorin durch Besetzen von Muskarinrezeptoren die ACh - Freisetzung direkt hemmen kann. Diese Theorie wird durch die eigenen Ergebnisse bekräftigt.

Um zu prüfen, ob Oxotremorin bei der ACh - Ruhefreisetzung die Spontanfreisetzung oder die Freisetzung durch fortgeleitete Aktionspotentiale hemmt, wurde die Wirkung von Oxotremorin in Gegenwart von Hexamethonium untersucht (Abb. 6). Dabei zeigte Oxotremorin keinen deutlich meßbaren Effekt auf die durch Hexamethonium gehemmte ACh - Freisetzung, so daß Oxotremorin wahrscheinlich nur die durch fortgeleitete Aktionspotentiale hervorgerufene ACh - Freisetzung und nicht die ACh - Spontanfreisetzung hemmt.

SZERB & SOMOGYI postulierten ferner, daß ACh wegen seiner muskarinartigen Wirkung über diesen lokalen negativen Feedback - Mechanismus seine eigene Freisetzung hemmen kann, indem es Muskarinrezeptoren besetzt. Mit diesem hemmenden Effekt des freigesetzten ACh auf die weitere Freisetzung von ACh läßt sich die beschriebene größere totale Freisetzung in mehrmals erneuerte Inkubationsflüssigkeiten gegenüber der Freisetzung in ein einzelnes, nicht erneuertes Inkubationsmedium mit derselben Zusammensetzung erklären (Tab. 1). Gleichlautende Ergebnisse wurden auch von verschiedenen oben erwähnten Autoren (SCHAUMANN; JOHNSON; BRODKIN & ELLIOT; BIRKS & MACINTOSH) an anderen Präparaten beschrieben. Diese Befunde widerlegen die Hypothese von KOELLE (1971; 1972), daß das aus den präsynaptischen Endigungen freigesetzte ACh an der präsynap-

tischen Membran wirkt, um über einen positiven Feedback - Mechanismus die Menge des freigesetzten ACh zu vergrößern.

Da fortgeleitete Aktionspotentiale nur das vesikuläre und nicht das Surplus - ACh freisetzen (KOELLE, 1971), würde somit der beschriebene lokale negative Feedback - Mechanismus, der durch ACh und Oxotremorin stimuliert werden kann, nur für die Freisetzung des vesikulären ACh gelten.

Für die Freisetzung von Noradrenalin ist ebenfalls ein negativer Feedback - Mechanismus beschrieben worden. Am Kaninchenherzen hemmten von außen zugesetztes Noradrenalin und die α - Sympathomimetika Phenylephrin und Oxymetazolin die evozierte Freisetzung von Noradrenalin aus adrenergen Nervenendigungen, während die α - Rezeptorenblocker Phenoxybenzamin und Phentolamin die Noradrenalinfreisetzung erhöhten (STARKE; STARKE & ALTMANN). Die Autoren folgerten aus diesen Versuchsergebnissen, daß Noradrenalin seine eigene Freisetzung über einen lokalen negativen Feedback - Mechanismus hemmt, indem es die α - Rezeptoren der präsynaptischen Membran besetzt.

Die durch Oxotremorin verminderte ACh - Freisetzung bei der Inkubation des Gewebes mit Cholinesterasehemmstoffen ging nicht mit einem vermehrten ACh - Gehalt des Gewebes einher (Tab. 2). Diesen Befund kann man dadurch

interpretieren, daß sich während der Inkubation mit DFP oder Eserin die ACh - Speicher durch Bildung von Surplus - ACh allmählich füllten. Bei der Inkubation ohne Oxotremorin wären dann die ACh - Speicher schon so stark gefüllt, daß auch die Inkubation mit Oxotremorin den ACh - Gehalt nicht weiter erhöhen könnte. Wurde das Gewebe jedoch nur 30 Minuten ohne Cholinesterasehemmer inkubiert, so war der ACh - Gehalt des Gewebes durch Inkubation mit Oxotremorin 10^{-4} M signifikant im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollversuchen erhöht (Tab. 2). Der ACh - Gehalt nach der 30 - minütigen (240 ± 12 pmol ACh/ mg) und der 150 - minütigen Inkubation (318 ± 16 pmol ACh/ mg) ohne Oxotremorin unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 5\%$). Ein signifikanter Unterschied ($P < 5\%$) besteht auch zwischen dem ACh - Gehalt des Gewebes nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten in Eserin (380 ± 39 pmol ACh/ mg) und in DFP (318 ± 16 pmol ACh/ mg).

Durch i. p. Injektion von Oxotremorin (1 mg/ kg Körpergewicht) wurde der ACh - Gehalt der Längsmuskelstreifen ebenfalls signifikant gegenüber dem Gehalt des Gewebes der Kontrolltiere erhöht, denen physiologische NaCl - Lösung i. p. injiziert wurde (0,5 ml/ kg Körpergewicht). Ein ähnlicher Befund ist auch von CAMPBELL, HANIN & JENDEN beschrieben;

sie konnten nachweisen, daß der ACh - Gehalt des Gehirns nach der Injektion von Oxotremorin zunimmt. Auch diese Befunde lassen sich durch den negativen Feedback - Mechanismus erklären, über den Oxotremorin die ACh - Freisetzung hemmen kann, was zu einer ACh - Akkumulation im Gewebe führt.

Oxotremorin scheint daher den ACh - Gehalt des Gewebes nur so lange zu erhöhen, bis die Speicherkapazität der cholinergen Nerven für ACh erschöpft ist. Diesen Effekt kann man aber auch ohne Oxotremorin erreichen, wenn man das Gewebe ausreichend lange mit Cholinesterasehemmern inkubiert, welche die Hydrolyse des freigesetzten ACh verhindern. Dann könnte das im Bad akkumulierte ACh durch den negativen Feedback - Mechanismus die Freisetzung von weiterem ACh immer mehr hemmen, wodurch die ACh - Speicher gefüllt werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Oxotremorin auf die ACh - Freisetzung wurde am isolierten Längsmuskelstreifen des Meerschweinchendünndarms untersucht. Das Gewebe wurde zunächst 90 Minuten mit DFP- oder eserinhaltiger Tyrodelösung äquilibriert, bevor das freigesetzte ACh gaschromatographisch bestimmt wurde.

Zur Bestimmung der ACh - Ruhefreisetzung wurde das Gewebe 60 Minuten lang in 10 - Minuten - Abständen mit DFP- oder eserinhaltiger Tyrodelösung oder in zwei 30 - Minuten - Intervallen in DFP - haltiger Tyrodelösung inkubiert. Bei der Inkubation mit DFP wurde im ersten 10 - Minuten - Intervall $3,9 \pm 0,6$ und im sechsten $3,2 \pm 0,5$ pmol ACh/ mg x 10 min freigesetzt. Die Werte bei der Inkubation mit Eserin lagen in derselben Größenordnung. Es wurde innerhalb von 30 Minuten mehr ACh freigesetzt, wenn die Badflüssigkeit in 10 - Minuten - Abständen erneuert wurde; die Unterschiede zur Freisetzung bei nicht erneuertem Inkubationsmedium sind jedoch nicht signifikant ($P < 10\%$; $> 5\%$).

Oxotremorin zeigte eine dosisabhängige Hemmung der ACh - Ruhefreisetzung. Oxotremorin 10^{-4} und 10^{-5} M hemmten die Freisetzung signifikant auf $65,0 \pm 7,4\%$ ($P < 1\%$) bzw. $72,8 \pm 6,0\%$ ($P < 5\%$). Oxotremorin hemmte die Freisetzung so lange es im Inkubationsmedium enthalten war.

Hexamethonium $2,8 \times 10^{-4}$ M hemmte die ACh - Ruhefreisetzung signifikant auf $66,3 \pm 3,6 \%$ ($P < 5 \%$). Oxotremorin 10^{-4} M zeigte in Gegenwart von Hexamethonium keine Wirkung auf die ACh - Ruhefreisetzung. Daher scheint Oxotremorin nur die durch fortgeleitete Aktionspotentiale ausgelöste ACh - Freisetzung zu hemmen.

Die durch Oxotremorin verminderte ACh - Ruhefreisetzung bei der Inkubation des Gewebes mit DFP oder Eserin ging nicht mit einem vermehrten ACh - Gehalt des Gewebes einher. Bei einer 30 - minütigen Inkubationszeit ohne Cholinesterasehemmer wurde der ACh - Gehalt des Gewebes durch Oxotremorin 10^{-4} M signifikant erhöht. Eine signifikante Erhöhung konnte auch nach i. p. Injektion von Oxotremorin (1 mg/ kg) nachgewiesen werden.

Die hemmende Wirkung von Oxotremorin auf die ACh - Freisetzung wurde durch einen lokalen negativen Feedback - Mechanismus erklärt, bei dem Oxotremorin wegen seiner muskarinartigen Wirkung durch Besetzen von Muskarinrezeptoren die ACh - Freisetzung direkt hemmen kann. Über diesen negativen Feedback - Mechanismus könnte dann auch das freigesetzte ACh die weitere Freisetzung von ACh hemmen. Der erhöhte ACh - Gehalt im Gewebe nach einer 30 - minütigen Inkubation oder nach i. p. Injektion von Oxotremorin läßt sich ebenfalls durch diesen lokalen negativen Feedback - Mechanismus erklären, über den Oxotremorin die ACh - Freisetzung hemmen kann, was zu einer Akkumulation von ACh im Gewebe führt.

F. LITERATUR

AMBACHE, N.:

Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as a broad sheet.

J. Physiol. 125, 53 - 54 P, 1954

BIRKS, R. & F. C. MACINTOSH:

Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion.

Can. J. Biochem. 39, 787 - 827, 1961

BRODKIN, E. & K. A. ELLIOT:

Binding of acetylcholine.

Amer. J. Physiol. 173, 437 - 442, 1953

CAMPBELL, R. C.:

Statistische Methoden für Biologie und Medizin.

Stuttgart, 1971

CAMPBELL, L. B., I. HANIN & J. JENDEN:

Gas chromatographic evaluation of the effects of some muscarinic and antimuscarinic drugs on acetylcholine levels in rat brain.

Biochem. Pharmacol. 19, 2053 - 2059, 1970

COX, B. & S. E. HECKER:

Investigation of the mechanism of action of oxotremorine on the guinea - pig isolated ileum preparation.

Brit. J. Pharmacol. 41, 19 - 25, 1971

DIKSHIT, B. B.:

Acetylcholine formation by tissues.

Quart. J. Exper. Physiol. 28, 243 - 251, 1938

FELDBERG, W. & R. C. Y. LIN:

Synthesis of acetylcholine in the wall of the digestive tract.

J. Physiol. 111, 96 - 118, 1950

GYÖRGY, L., A. K. PFEIFER & J. KENYERES:

The interaction of hemicholinium-3 and oxotremorine in isolated organ preparations.

J. Pharm. Pharmacol. 22, 96 - 100, 1970

KUIG, L. P. & B. J. POLGAR:

Comparsion of the stimulating effects of nicotine, pilocarpine and histamine on the superior cervical ganglion of the cat.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 151, 430 - 437, 1966

JOHNSON, E. S.:

The origin of the acetylcholine released spontaneously from the guinea - pig isolated ileum.

Brit. J. Pharmacol. 21, 555 - 568, 1963

KILBINGER, H.:

Gas chromatographic estimation of acetylcholine in the rabbit heart using a nitrogen selective detector.

J. Neurochem. 21, 421 - 429, 1973

KOELLE, G. B.:

• Current concepts of synaptic structure and function.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 183, 5 - 20, 1971

KOELLE, G. B.:

Acetylcholine - current status in physiology, pharmacology and medicine.

N. Engl. J. Med. 286, 1086 - 1090, 1972

MCISAAC, R. J. & N. R. MILLERSCHOEN:

A comparison of the effects of mecamlamine and hexamethonium on transmission in the superior cervical ganglion of the cat.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 139, 18 - 24, 1963

PATON, W. D. M.:

The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea - pig ileum.

Brit. J. Pharmacol. 12, 119 - 127, 1957

PATON, W. D. M. & R. J. VIZI:

The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea - pig ileum longitudinal muscle strip.

Brit. J. Pharmacol. 35, 10 - 28, 1969

PATON, W. D. M., R. J. VIZI & M. A. ZAR:

The mechanism of acetylcholine release from parasympathetic nerves.

J. Physiol. 215, 819 - 848, 1971

PATON, W. D. M. & M. A. ZAR:

A denervated preparation of the longitudinal muscle of the guinea - pig ileum.

J. Physiol. 179, 85 - 86 P, 1965

PATON, W. D. M. & M. A. ZAR:

The origin of acetylcholine released from guinea - pig intestine and longitudinal muscle strips.

J. Physiol. 194, 13 - 33, 1968

SCHAUMANN, W.:

Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from the intestine of the guinea - pig.

Brit. J. Pharmacol. 12, 115 - 118, 1957

RANG, H. P.:

Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle.

Brit. J. Pharmacol. 22, 356 - 365, 1964

STARKE, K.:

Alpha sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart.

Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 18 - 45, 1972

STARKE, K. & K. P. ALTMANN:

Inhibition of adrenergic neurotransmission by clonidine: an action on prejunctional α - receptors.

Neuropharmacology 12, 339 - 347, 1973

SZERB, J. C. & G. T. SOMOGYI:

Depression of acetylcholine release from cerebral cortical slices by cholinesterase inhibition and by oxotremorine.

Nature 241, 121 - 122, 1973

TRENDELENBURG, U.:

Some aspects of the pharmacology of autonomic ganglion cells.

Ergeb. Physiol. 59, 1 - 85, 1967

VOLLE, R. L. & G. B. KOELLE:

Ganglionic stimulating and blocking agents. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed. by L. S. GOODMAN & A. GILMAN; New York 1970; S. 585 - 600.

WELSH, J. H. & J. E. HYDE:

Acetylcholine content of the myenteric plexus and resistance to anoxia.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N. Y. 55, 256 - 257, 1944

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Ass.-Prof. Dr. H. Kilbinger, unter dessen Anleitung die vorliegende Arbeit entstanden ist. Er war mir behilflich bei der Durchführung der Versuche, sowie bei der Abfassung des Textes und der Beschaffung der Literaturhinweise.

Lebenslauf

Am 8. März 1949 wurde ich, Peter Wagner, als ältester Sohn der Eheleute Karl und Maria Wagner, geb. Uhren, in Schankweiler, Krs. Bitburg - Prüm geboren. Vom 6. bis zum 12. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule meines Heimatortes und wechselte 1961 an das altsprachliche private St. Josef - Gymnasium nach Biesdorf, Krs. Bitburg - Prüm über, wo ich am 7. Juni 1969 das Abitur ablegte. Von Anfang Juli 1969 bis Ende März 1970 leistete ich bei der Bundeswehr meinen Wehrdienst ab. Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz, wo ich im März 1971 die naturwissenschaftliche und im Oktober 1972 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Ich bin nun im 10. Semester (5. klin.) und beabsichtige, nach dem 11. Semester mein Staatsexamen abzulegen.

